Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 11, No. 4, Winter 2020, p. 463-479

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد 11، شماره 4، زمستان 1398، ص. 479-463

اثرات اسانس مرزنگوش، شاه‌اسپرم، گندواش، رازیانه و کاج بر جوجه‌های گوشتی: اثرات ضدباکتریایی *In-Vitro* و عملکرد، مورفولوژی ژئوژنوم و جمعیت میکروبی ایلئوم

علی خطیب جو[1*]، مریم اعلائی[2]، فرشید فتاح‌نیا[3]، مصطفی نعمتی[4]، دکتر محمدرضا حافظی احمدی[5] و دکتر هومن فرزادی[6]

تاریخ دریافت : 1397/10/04
تاریخ پذیرش: 1398/03/21

چکیده

اثرات ضد باکتریایی اسانس‌های هیدروالکلی مرزنگوش، شاه‌اسپرم، گندواش، رازیانه و کاج بر باکتری‌های اشریشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه و *سالمونلا تیفی‌موریوم* در شرایط *in-vitro* و حیوان زنده مورد ارزیابی قرار گرفت. در آزمایش اول تأثیر اسانس‌های هیدروالکلی بر قطر هاله عدم رشد باکتری‌های اشریشیاکلی، *کلبسیلا پنومونیه و سالمونلا تیفی‌موریوم* در مقایسه با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین در محیط *in-vitro* مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج آزمایش *in-vitro*، در آزمایش دوم اثر سه اسانس هیدروالکلی مرزنگوش، شاه‌اسپرم و گندواش بر عملکرد، مورفولوژی و بافت روده و جمعیت باکتری‌های دستگاه گوارش مورد بررسی قرار گرفت. تعداد 384 قطعه جوجه گوشتی سویه راس-308 (مخلوط مساوی از هر دو جنس) در قالب طرح کاملاً تصادفی به 8 تیمار، 4 تکرار و 12 قطعه جوجه در هر تکرار اختصاص داده شد. به دلیل اثرات مثبت اسانس‌های مرزنگوش، گندواش و شاه‌اسپرم در آزمایش اول، تیمارهای آزمایش دوم عبارت بودند از: 1) جیره پایه (شاهد)، 2) جیره پایه + 200 میلی‌گرم در کیلوگرم آنتی‌بیوتیک کلی‌استاپ 10، 3 و 4) جیره پایه + 200 و 400 میلی‌گرم اسانس مرزنگوش در کیلوگرم جیره، 5 و 6) جیره پایه + 200 و 400 میلی‌گرم اسانس گندواش در کیلوگرم جیره و 7 و 8) جیره پایه + 200 و 400 میلی‌گرم اسانس شاه‌اسپرم در یک کیلوگرم جیره. در هفته دوم جوجه‌های هر تکرار به 3 گروه 4 تایی تقسیم شدند و با یک میلی‌لیتر محلول حاوی 1×10^9 cfu باکتری‌های اشریشیاکلی و *سالمونلا تیفی‌موریوم* از طریق خوراکی آلوده شدند. نتایج آزمایش اول نشان داد که در مقایسه با اسانس‌های کاج و گندواش، اسانس‌های رازیانه، شاه‌اسپرم و مرزنگوش مانع رشد باکتری‌های اشریشیاکلی و *سالمونلا تیفی‌موریوم* شدند و در مقایسه با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به اسانس شاه‌اسپرم بود. نتایج آزمایش دوم نشان داد که افزودن اسانس‌ها به جیره جوجه‌های گوشتی موجب بهبود مقادیر خوراک مصرفی روزانه و افزایش وزن و عدم تأثیر بر ضریب تبدیل خوراک جوجه‌های گوشتی آلوده شده، شدند. افزودن اسانس مرزنگوش سبب افزایش درصد لنفوسیت و کاهش نسبت هتروفیل به لنفوسیت در جوجه‌های آلوده شده با باکتری اشریشیاکلی شد. اسانس‌ها سبب افزایش جمعیت باکتری‌های لاکتوباسیل جوجه‌های سالم و کاهش جمعیت باکتری اشریشیاکلی در گروه آلوده شده با باکتری اشریشیا-کلی شدند. به‌طور کلی، آنتی‌بیوتیک قابلیت جایگزینی با اسانس‌ها را دارد و قادر به کاهش اثرات نامساعد سالمونلوز و کلی‌باسیلوز در جوجه‌های گوشتی شد.

واژه‌های کلیدی: اسانس، اشریشیاکلی، جوجه گوشتی، *سالمونلا تیفی‌موریوم*، عملکرد

مقدمه

آنتی‌بیوتیک‌ها به منظور کاهش یا جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها و بهبود عملکرد طیور به‌کار می‌روند (9). زمانی که آنتی‌بیوتیک‌ها به‌صورت طولانی مدت استفاده شوند، سبب بروز مقاومت دارویی عوامل بیماری‌زا می‌شوند. به‌علاوه، امکان باقیماندن آنتی‌بیوتیک‌ها در فرآورده‌های طیور نیز وجود دارد که مصرف این فرآورده‌ها توسط انسان، سبب مقاومت عوامل بیماری‌زا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود. بسیاری از کشورها استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان یک افزودنی در خوراک دام و طیور را ممنوع کرده‌اند (13). در چند دهه اخیر، استفاده از متابولیت‌های گیاهی نظیر عصاره و اسانس به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها از نظر خواص ضد میکروبی مورد بررسی قرار گرفته‌اند (16، 28). اسانس‌ها ترکیباتی از مواد معطر و

1- استادیار گروه علوم دامی دانشگاه ایلام
2- دانش آموخته دکتری علوم دامی دانشگاه ایلام
3- دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه ایلام
4- استادیار گروه میکروبیولوژی دانشکده پیرادامپزشکی دانشگاه ایلام
5- استاد بافت شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایلام
6- دکتری دامپزشکی دانشگاه شهرکرد
(*- نویسنده مسئول: Email: a.khatibjoo@ilam.ac.ir)
DOI:10.22067/ijasr.v11i4.77873

فرار هستند که ترکیبات و میزان غلظت این ترکیبات در گیاهان مختلف بسیار متفاوت است (18، 24). اغلب اسانس‌ها دارای خواص ضدباکتریایی، ضد ویروسی، ضد انگلی و آنتی‌اکسیدانی هستند که این به دلیل وجود گروه‌های فعال و آروماتیک مانند ترپن‌ها و فنیل‌پروپن-ها در ساختار آن‌ها می‌باشد (13، 24). این مواد به علت چربی دوست بودن، به غشاء سلولی باکتری‌ها رخنه کرده و وارد بخش‌های داخلی میکروارگانیسم‌ها می‌شوند. در مطالعات *in-vitro* نشان داده شده است که عصاره‌های گیاهی بر قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها تأثیرگذار هستند و به عبارت دیگر، مانع از رشد باکتری‌ها یا نابودی آن‌ها می-شوند (2، 27).

اسانس‌های گیاهان دارویی به علت داشتن اثرات سودمند، به‌طور قابل ملاحظه‌ای در جیره طیور مورد استفاده قرار گرفته‌اند. اسانس‌ها دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند و سبب کاهش باکتری‌های بیماری‌زایی و احتمالاً افزایش وضعیت ایمنی طیور می‌شوند (4، 11). در زمینه تأثیر اسانس گیاهان دارویی بر عملکرد، ایمنی و میکروبیولوژی دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی و مرغ‌های تخم‌گذار مطالعات مختلفی انجام شده است به طور مثال، استفاده از آویشن به صورت پودر گیاه یا اسانس منجر به افزایش وزن و توده بدن شد در حالیکه اسانس یا اجزای اصلی آن بر بازده خوراک جوجه‌های گوشتی تأثیر نداشت (7، 8). همچنین در مطالعه‌ای دیگر گزارش شد که جیره دارای 50 میلی‌گرم بر کیلوگرم ترکیبی از اسانس‌ها و سدیم باربیتورات نسبت به جیره شاهد، میزان باکتری سالمونلا را در سکوم کاهش داد اما بر عملکرد جوجه‌های گوشتی تأثیرگذار نبود (6). بسیاری از ویژگی های سودمند گیاهان دارویی به دلیل وجود مواد موثره موجود در آنها مانند کارواکرول، تیمول و میرسن می‌باشد و بیشتر فعالیتهای بیولوژیکی اثبات شده این مواد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریایی می‌باشد. با توجه به نتایج متناقض استفاده از گیاهان دارویی و عدم وجود آزمایش همزمان در محیط آزمایشگاهی و موجود زنده، هدف از این مطالعه، بررسی اثر ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی در شرایط *in-vitro* و *in-vivo* بر عملکرد و ایمنی جوجه‌های گوشتی سالم و آلوده شده با باکتری اشریشیاکلی و *سالمونلا تیفی‌موریوم* بود.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در سال 1395 در دانشگاه ایلام در قالب 2 آزمایش انجام شد. در آزمایش اول اسانس پنج گونه گیاهی مرزنگوش، رازیانه، شاه‌اسپرم، کاج و گندواش از شرکت گیاه‌اسانس استان گلستان تهیه شد و پنج سویه باکتری شامل اشریشیاکلی (*Escherichia coli* PTCC 1399 (ATCC 25922))، *کلبسیلا پنومونه* (*Klebsiella pneumonia* PTCC 1053(ATCC 1003))، *سالمونلا تیفی‌موریوم* (*Salmonella typhimurium* PTCC1609)، *استافیلوکوکس آرئوس* (*Staphylococcus aureus* PTCC 1764(ATCC 13813)) و *استرپتوکوکوس پیوژنز* (*Streptococcus pyogenes* PTCC 1447(CIP 54.5)) از مرکز منطقه‌ای کلکسیون قارچها و باکتری‌های صنعتی ایران تهیه شدند. باکتری‌های مورد نظر به درون محیط کشت TSB تلقیح شده و به مدت 24 ساعت درون انکوباسیون قرار گرفتند. سپس توسط دستگاه اسپکتوفوتومتری غلظت باکتری به نیم مک فارلند (10^6) کاهش داده شد. برای بررسی اثرات ضد میکروبی، از دو روش انتشار در آگار به روش انتشار روی دیسک (Disc diffusion) برای حداقل غلظت کشندگی (Minimal Bactericide Concentration) و برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimal Inhibitory Concentration) روش رقت در آگار استفاده شد (26). بعد از کشت یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری مورد نظر به صورت چمنی در سطح پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار، دیسک‌های استریل تهیه شدند و پس از تماس کامل با محیط کشت با فاصله مناسب از یکدیگر، با سمپلر استریل مقدار 20 میلی‌گرم از اسانس‌های گیاهی رقیق شده با دی‌متیل سولفوکساید به غلظت‌های 0/2، 2، 4، 10 و 20 میلی‌گرم بر لیتر رسانده شده و روی دیسک‌ها ریخته شدند. قطر هاله ممانعت از رشد پس از 24 ساعت انکوباسیون پلیت‌ها در دمای 37 درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. اثرات ضدمیکروبی اسانس‌ها در مقایسه با دیسک‌های آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین و جنتامایسین به عنوان شاهد، مورد بررسی قرار گرفتند. آزمایش تعیین اثر ضدمیکروبی با 4 تکرار انجام و متوسط فعالیت ضدمیکروبی گزارش شد. برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی از روش رقت در آگار استفاده شد، بدین صورت که در محیط کشت مولر هینتون آگار 50-1000 میکرولیتر (1 cc، 500 µl، 400µl، 300 µl، 200 µl، 100 µl و 50 µl) از هر اسانس اضافه شد. بعد از بسته شدن محیط کشت، پلیت‌ها به دورن هود انتقال داده شد و باکتری‌ها به میزان 5 µl به محیط کشت‌ها تلقیح شدند. پس از خشک شدن باکتری‌ها، محیط‌کشت‌ها را درون انکوباسیون 37 درجه سانتی‌گراد انتقال و پس از 24 ساعت حداقل غلظت مهارکنندگی تعیین شد.

آزمایش دوم این پژوهش در سالن مرغداری دانشگاه ایلام با استفاده از تعداد 384 قطعه جوجه گوشتی یک روزه سویه راس-308 (مخلوط مساوی از دو جنس) با میانگین وزنی 42 گرم اجرا شد. این پژوهش به صورت طرح کاملاً تصادفی با 8 تیمار، 12 تکرار و 4 قطعه جوجه در هر تکرار انجام شد. جیره‌های آزمایشی عبارت بودند از: 1) جیره پایه (شاهد)، 2) جیره پایه به علاوه آنتی‌بیوتیک کلی‌استاپ 10 (200 میلی‌گرم در یک لیتر آب)، 3 و 4) جیره پایه + 200 و 400 میلی‌گرم در کیلوگرم جیره اسانس مرزنگوش، 5 و 6) جیره پایه +

200 و 400 میلی‌گرم در کیلوگرم جیره اسانس گندواش و 7 و 8) جیره پایه + 200 و 400 میلی‌گرم در کیلوگرم جیره اسانس شاه اسپرم. برای تعیین نیاز غذایی جوجه‌ها در دوره‌های مختلف پرورش و همچنین برآورد مواد مغذی اجزای جیره از راهنمای نیازمندی‌های سویه راس-308 (2014)، از 14-1 روزگی و با استفاده از نرم‌افزار جیره‌نویسی UFFDA انجام شد (جدول 1).

جدول 1- مواد خوراکی تشکیل دهنده و ترکیب شیمیایی جیره پایه از 14-1 روزگی (گرم در کیلوگرم)

Table 1- Feed ingredient and nutrient composition of basal diet from 1-14 d (g/kg)

ماده خوراکی (گرم بر کیلوگرم) Ingredient (g/kg)	14-1 روزگی 1-14 d	ترکیب شیمیایی محاسبه شده Feed Calculated Analysis	14-1 روزگی 1-14 d
ذرت Corn	53.07	انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری/کیلوگرم) Metabolizable Energy (Kcal/kg)	2900
کنجاله سویا (44% پروتئین خام) Soybean meal (44 % CP)	33.00	پروتئین خام Crude protein	237
گلوتن ذرت (60 درصد پروتئین) Corn gluten meal (60% CP)	7.50	ترئونین قابل هضم ایلئومی Threonine SID2	7.9
روغن سویا Soybean oil	2.00	متیونین قابل هضم ایلئومی Methionine SID	5.7
دی‌کلسیم فسفات Di-Calcium phosphate	1.52	متیونین+ سیستین قابل هضم ایلئومی Methionine + Cystine SID	9.0
کربنات کلسیم Calcium carbonate	1.33	لیزین قابل هضم ایلئومی Lysine SID	12.4
نمک طعام Salt	0.25	کلسیم Calcium	10.0
مکمل مواد معدنی1 Mineral premix1	0.25	فسفر قابل دسترس Available phosphorus	5.0
مکمل ویتامینه1 Vitamin premix1	0.25	سدیم Sodium	1.8
ال- ترئونین L-Threonine	0.05	کلر Chlorine	2.3
دی‌ال- متیونین DL- methionine	0.23	تعادل آنیون-کاتیون (میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم) DCAB (mEq/Kg)	226
ال- لیزین هیدروکلراید L-Lysine HCL	0.31	اسید لینولئیک Linoleic acid	12.5

1 هر کیلوگرم جیره حاوی: 13500 واحد بین المللی ویتامین A ترانس رتینول؛ 5000 واحد بین المللی ویتامین D_3؛ 30 واحد بین المللی ویتامین E توکوفریل استات؛ 2 میلی‌گرم ویتامین K_3؛ 1 میلی‌گرم ویتامین B_1، 6 میلی‌گرم ویتامین B_2؛ 30 میلی‌گرم ویتامین نیاسین؛ 12 میلی‌گرم پانتوتنیک اسید؛ 3 میلی‌گرم ویتامین B6؛ 10 میلی‌گرم ویتامین B_{12}؛ 0/1 میلی‌گرم بیوتین؛ 500 میلی‌گرم کولین کلراید؛ 50 میلی‌گرم آهن؛ 8 میلی‌گرم مس؛ 80 میلی‌گرم منگنز؛ 60 میلی‌گرم روی؛ 0/5 میلی‌گرم ید؛ 0/2 میلی‌گرم کبالت؛ 0/15 میلی‌گرم سلنیوم. 2 اسید آمینه قابل هضم استاندارد شده ایلئومی.

1 Each kg of diet contained: Vitamin A, 13500 I.U. trans retinol; Vitamin D_3, 5000 I.U.; Vitamin E, 30 I.U. DL-α-tocopheryl acetate; Vitamin K_3, 2 mg; Vitamin B_1, 1 mg; Vitamin B_2, 6 mg; niacin, 30 mg; pantothenic acid, 12 mg; Vitamin B6, 3 mg; Vitamin B_{12}, 10 µg; biotin, 0.1 mg; choline chloride, 500 mg; Fe, 50 mg; Cu, 8 mg; Mn, 80 mg; Zn, 60 mg; I 0.5 mg; Co, 0.2 mg; Se, 0.15 mg.
2 SID= Standardized ileal digestibility.

به منظور ایجاد آلودگی در روز هشتم، تکرارهای هر تیمار به 3 گروه 4 تایی (4 تکرار با 4 جوجه در هر تکرار) تقسیم و به ترتیب به گروه سالم، آلوده شده با باکتری اشریشیاکلی و آلوده شده با باکتری سالمونلا اختصاص داده شدند. در روز هشتم آزمایش، 4 جوجه در هر تکرار با یک میلی‌لیتر محلول حاوی دارای 10^9 cfu باکتری اشریشیا-کلی (ATCC 25922) و 4 جوجه در هر تکرار با یک میلی‌لیتر محلول حاوی دارای 10^9 cfu باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* (ATCC 1609) از طریق خوراکی آلوده شدند. به‌دلیل اینکه آنتی‌بیوتیک ویرجینامایسین عموماً به عنوان یک ماده محرک رشد استفاده می‌شود و استفاده درمانی موثری ندارد، در این آزمایش در هنگام آلوده کردن جوجه‌ها از آنتی‌بیوتیک کلی استاپ10 استفاده شد. میزان مصرف خوراک، افزایش وزن جوجه‌ها، ضریب تبدیل خوراک و تلفات جوجه‌ها در هفته اول و دوم (بدون آلودگی و با آلودگی) اندازه‌گیری و ثبت شد.

روز 7 و 14 آزمایش، از تمام جوجه‌ها به وسیله سرنگ 2/5 میلی‌لیتری از سیاهرگ زیر بال نمونه خون گرفته شد. لازم به ذکر است که خون درون لوله‌های آزمایشی حاوی ماده ضد انعقاد اتیلن دی‌آمین تترااستیک اسید (EDTA) جمع‌آوری و شمارش هتروفیل و لنفوسیت نمونه‌ها از طریق مشاهده و شمارش آنها بعد از رنگ‌آمیزی گیمسا در زیر میکروسکوپ نوری انجام شد.

تمام جوجه‌ها در 14 روزگی (سالم و بیمار) به روش جابجایی گردن کشته شدند و قسمت‌های مختلف روده آن‌ها جهت کشت میکروبی (لاکتوباسیلوس، اشیریشیاکلی و سالمونلا) سریعاً به آزمایشگاه منتقل شدند. شمارش لاکتوباسیل‌ها، سالمونلا و اشریشیا-کلی ایلئوم جوجه‌های بدون آلودگی و آلوده شده با استفاده از روش رقیق‌سازی متوالی در محیط کشت (EMB: Eosin methylene blue agar) محیط کشت اختصاصی اشریشیاکلی و MRS (محیط کشت اختصاصی لاکتوباسیل) انجام شد (29). همچنین از ژئوژنوم روده جوجه‌های سالم و آلوده شده، نمونه‌برداری شد و نمونه‌ها در محلول 10 درصد فرمالین قرار داده شد. سپس از روده‌ها سطح مقطع تهیه و رنگ‌آمیزی و میزان آسیب به سلول‌های روده، سلول‌های گابلت و ماکروفاژها بررسی شد. همچنین طول ویلی ناحیه ژئوژنوم نیز اندازه‌گیری شد. داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS نسخه 9/4 و با استفاده از رویه GLM آنالیز شدند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش چنددامنه‌ای دانکن (در سطح احتمال 5 درصد) انجام شد.

نتایج

آزمایش اول

باکتری‌ها در غلظت‌های20، 30، 40 و 50 میلی‌گرم اسانس مرزنگوش و شاه‌اسپرم رشد نکردند (P > 0/05) اما در غلظت 10 میلی‌گرم همه باکتری‌ها پس از گذشت 24 ساعت رشد کردند (0/05 > P). حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) این اسانس‌ها برای تمام باکتری‌ها 20 میلی‌گرم بود. نتایج نشان داد که اسانس گندواش در غلظت 50 میلی‌گرم مانع رشد باکتری‌ها نشد (P > 0/05) و MIC این اسانس برای باکتری‌ها ممکن است 100 میلی‌گرم باشد. اسانس رازیانه در غلظت 50 میلی‌گرم سبب مهار رشد باکتری اشرشیاکلی شد (P < 0/05) اما بر رشد باکتری‌های *کلبسیلا پنومونه* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* تأثیری نداشت (P > 0/05) و غلظت 50 میلی‌گرم اسانس کاج، مانع رشد باکتری کلبسیلا پنومونیه نشد (P > 0/05). بنابراین، MIC اسانس کاج برای باکتری کلبسیلا ممکن است غلظت 100 میلی‌گرم باشد. در غلظت 40 میلی‌گرم اسانس کاج، باکتری‌های اشرشیاکلی و *سالمونلا تیفی‌موریوم* رشد کردند (P > 0/05). اسانس‌های رازیانه، شاه‌اسپرم و مرزنگوش سبب ممانعت از رشد باکتری اشرشیاکلی شدند (P < 0/05) و اسانس شاه‌اسپرم و مرزنگوش در غلظت‌های 50 و 40 میلی‌گرم قطر هاله عدم رشد بیشتری نسبت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین داشتند.

جدول 2- تأثیر اسانس و آنتی‌بیوتیک بر میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری‌های اشریشیاکلی و *سالمونلا تیفی‌موریوم* (میلی‌متر)[1]

Table 2- Effect of essential oil and antibiotic on mean of minimal inhibitory concentration of *Escherichia coli* and *salmonella typhimurium* (mm) (experiment 1 *In-Vitro*)[1]

غلظت (میکرولیتر)	*Salmonella typhimurium*[2]			*Escherichia coli*[2]				
Concentration (µl)	Marjoram	TB	Fennel	Pinus	AR	Marjoram	TB	Fennel
50	15.73^{a}	17.34^{a}	8.28^{abc}	11.68	16.28	25.32^{a}	23.29^{a}	17.57^{a}
40	16.12^{a}	15.28^{ab}	6.57^{bc}	12.39	16.12	20.09^{b}	21.79^{ab}	16.26^{ab}
30	15.62^{a}	11.33^{c}	5.61^{bc}	12.53	14.32	18.42^{bc}	18.26^{bc}	15.03^{abc}
20	12.59^{b}	10.21^{cd}	5.14^{bc}	10.31	12.69	16.34^{bcd}	16.39^{dc}	13.17^{bc}
10	11.32^{b}	8.29^{d}	2.33^{c}	9.33	11.37	14.33^{d}	13.32^{d}	11.38^{c}
جنتامایسین Gentamicin	12.58^{b}	12.58^{bc}	12.62^{ab}	12.78	12.64	12.57^{d}	12.72^{d}	12.71^{bc}
تتراسایکلین Tetracycline	15.67^{a}	15.61^{ab}	15.58^{a}	15.72	15.47	15.82^{cd}	15.64^{dc}	15.66^{bc}
SEM[3]	0.92	0.99	2.78	1.35	1.84	1.30	1.43	1.41
P-Value	0.01	0.0001	0.05	0.08	0.35	0.0002	0.0008	0.05

[1] در هر ستون اعداد با حروف غیر مشابه از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری دارند (P<0/05).

[2] TB= شاه اسپرم (*Tanacetum balsamita*) و AR= آرتمیزیا (*Artemisia annua*).

[3] SEM= خطای استاندارد میانگین‌ها

[1] Means within the same line with no common superscript letter differ significantly (P < 0.05).

[2] TB= *tanacetum balsamita*, AR= *Artemisia annua.*

[3] SEM= Standard error of means.

اسانس شاه‌اسپرم در غلظت‌های50 و 40 میلی‌گرم عملکرد بهتری نسبت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین داشت (P < 0/05) و اسانس مرزنگوش در غلظت 20 و 10 میلی‌گرم، قطر هاله عدم رشد مشابه با آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین داشت و در همین غلظت‌ها قطر هاله عدم رشد بیشتری نسبت به هر دو آنتی‌بیوتیک داشت. غلظت‌های مختلف اسانس‌های کاج و گندواش مانع رشد باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* نشدند و اختلاف معنی‌داری با آنتی‌بیوتیک‌ها نداشتند (جدول 2) اما اختلاف میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* بین غلظت‌های مختلف اسانس‌های رازیانه، شاه‌اسپرم و مرزنگوش با آنتی‌بیوتیک‌ها معنی‌دار بود (P < 0/05).

جدول 3- تأثیر اسانس و آنتی‌بیوتیک بر میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *کلبسیلا پنومونیه* (میلی‌متر)[1]

Table 3- Effect of essential oil and antibiotic on mean of minimal inhibitory concentration of *Klebsiella pneumonia* (mm) (experiment 1 *In-Vitro*)[1]

غلظت (میکرولیتر) Concentration (µl)	Pinus	*Artemisia annua*	Marjoram	*Tanacetum balsamita*	Fennel
50	11.18^{abc}	19.12^{a}	20.04^{a}	19.33^{a}	13.96^{a}
40	10.55^{bc}	17.83^{ab}	16.27^{b}	17.04^{ab}	10.08^{abc}
30	10.32^{bc}	15.72^{abc}	15.03^{b}	13.69^{bcd}	11.32^{ab}
20	9.33^{c}	13.57^{cd}	14.05^{b}	12.09^{cd}	8.27^{bc}
10	8.08^{c}	10.29^{d}	10.32^{c}	10.72^{d}	5.74^{c}
جنتامایسین Gentamicin	14.27^{a}	14.27^{bc}	14.31^{b}	14.28^{bc}	14.34^{a}
تتراسایکلین Tetracycline	13.16^{ab}	13.04^{cd}	13.14^{bc}	13.02^{cd}	13.08^{ab}
SEM[2]	1.14	1.20	1.19	1.11	1.73
P-Value	0.02	0.003	0.002	0.001	0.02

[1] در هر ستون اعداد با حروف غیر مشابه از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری دارند (P<0/05).

[2] SEM= خطای استاندارد میانگین‌ها

[1] Means within the same line with no common superscript letter differ significantly (P < 0.05).

[2] SEM= Standard error of means.

اسانس‌های شاه‌اسپرم و مرزنگوش در غلظت 50 میلی‌گرم، قطر هاله عدم رشد بیشتری نسبت به جنتامایسین داشتند (P < 0/05). قطر هاله عدم رشد باکتری *کلبسیلا پنومونیه* در اثر اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها در جدول 3 نشان داده شده است. در غلظت 50 میلی‌گرم، سه اسانس مرزنگوش، شاه‌اسپرم و گندواش میانگین قطر هاله عدم رشد بیشتری نسبت به جنتامایسین و تتراسایکلین داشتند (P <0/05). بیشترین و کمترین قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها به ترتیب به اسانس مرزنگوش و اسانس کاج تعلق داشت و تفاوتی بین آنتی‌بیوتیک‌ها و اسانس رازیانه از لحاظ قطر هاله عدم رشد مشاهده نشد (P <0/05).

آزمایش دوم:

افزودن اسانس‌ها به جیره در هفته اول دوره پرورش (بدون آلودگی) بر عملکرد جوجه‌های گوشتی تأثیر نداشت (جدول 4؛ 0/05 < P). نتایج این آزمایش نشان داد که طی هفته دوم و بعد از اعمال آلودگی با اشریشیاکلی و سالمونلا، افزودن اسانس مرزنگوش، گندواش و شاه‌اسپرم تأثیری بر افزایش وزن جوجه‌های گوشتی سالم و آلوده شده نداشت (جدول 5؛ 0/05 < P) در حالیکه بر ضریب تبدیل و خوراک مصرفی جوجه‌های گوشتی تأثیر معنی‌داری داشتند (0/05 > P).

افزودن آنتی‌بیوتیک یا 400 میلی‌گرم اسانس شاه‌اسپرم و مرزنگوش و 200 میلی‌گرم اسانس شاه‌اسپرم به جیره جوجه‌های سالم سبب افزایش خوراک مصرفی شد (P < 0/05). همچنین افزودن آنتی‌بیوتیک، اسانس مرزنگوش و 400 میلی‌گرم اسانس شاه‌اسپرم به جیره جوجه‌های سالم سبب افزایش وزن بدن جوجه‌های گوشتی شد (P < 0/05) و بهترین ضریب تبدیل خوراک مربوط به تیمار شاهد و جیره دارای 200 میلی‌گرم اسانس مرزنگوش و 400 میلی‌گرم اسانس مرزنگوش در جوجه‌های سالم بود (P > 0/05). در مقابل، افزودن کلیه اسانس‌ها به‌خصوص اسانس مرزنگوش موجب افزایش خوراک مصرفی و وزن بدن جوجه‌های گوشتی آلوده شده با باکتری اشریشیاکلی شد (P < 0/05). تفاوت معنی‌داری بین ضریب تبدیل خوراک گروه دریافت کننده 200 میلی‌گرم اسانس شاه‌اسپرم و 400 میلی‌گرم اسانس مرزنگوش با گروه شاهد در جوجه‌های گوشتی آلوده شده با باکتری اشریشیاکلی نداشتند (P > 0/05). در جوجه‌های آلوده شده با باکتری سالمونلا، در مقایسه با گروه شاهد، افزودن کلیه اسانس‌ها موجب افزایش خوراک مصرفی و وزن بدن جوجه‌های گوشتی آلوده شده شد (P < 0/05) اما بین ضریب تبدیل خوراک تیمارهای مختلف، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (P > 0/05).

جدول 4- تأثیر تیمارهای آزمایشی بر عملکرد جوجه‌های گوشتی از 1 تا 7 روزگی[1]

Table 4- Effect of dietary treatments on broiler chickens performance from 1-7 day of age[1]

جیره‌های آزمایشی Experimental diets	خوراک مصرفی (گرم) Feed intake (g)	وزن بدن (گرم) Body weight (g)	ضریب تبدیل Feed conversion ratio
جیره پایه (شاهد) Basal diet	243	199	1.22
جیره پایه + آنتی‌بیوتیک ویرجینیامایسین (PPM 200) Basal diet + Virginiamycin	210	197	1.06
جیره پایه + اسانس مرزنگوش (PPM 200) Basal diet + Marjoram (200 mg/kg)	201	182	1.13
جیره پایه + اسانس مرزنگوش (PPM 400) Basal diet + Marjoram (400 mg/kg)	194	176	1.11
جیره پایه + اسانس گندواش (PPM 200) Basal diet + *Artemisia annua* (200 mg/kg)	216	188	1.16
جیره پایه + اسانس گندواش (PPM 400) Basal diet + *Artemisia annua* (400 mg/kg)	217	183	1.19
جیره پایه + اسانس شاه‌اسپرم (PPM 200) Basal diet + *Tanacetum balsamita* (200 mg/kg)	219	181	1.21
جیره پایه + اسانس شاه‌اسپرم (PPM 400) Basal diet + *Tanacetum balsamita* (400 mg/kg)	223	181	1.19
SEM[2]	9.5	7.5	0.056
P-Value	0.06	0.37	0.31

[1] در هر ستون اعداد با حروف غیر مشابه از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری دارند (P<0/05).

[2] SEM= خطای استاندارد میانگین‌ها

[1] Means within the same line with no common superscript letter differ significantly (P < 0.05).
[2] SEM= Standard error of means.

جدول 5- تأثیر تیمارهای آزمایشی بر مقادیر خوراک مصرفی، افزایش وزن و ضریب تبدیل خوراک جوجه‌های گوشتی (14-8 روزگی)[1]

Table 5- Effect of dietary treatments on the amount feed intake, body weight and FCR of broiler chickens from 8-14 day of age[1]

جیره‌های آزمایشی[2] Experimental diets[2]	No Challenge[3]			Challenged with E. coli[3]			Challenged with Salmonella[3]		
	FI (g)	BW (g)	FCR	FI (g)	BW (g)	FCR	FI (g)	BW (g)	FCR
1	491^{b}	260^{b}	1.88^{b}	411^{c}	218^{b}	1.88^{c}	443^{d}	199^{c}	2.23^{ab}
2	604^{a}	303^{a}	1.99^{ab}	482^{b}	239^{a}	2.01^{b}	490^{c}	231^{a}	2.12^{b}
3	539^{b}	286^{b}	1.88^{b}	548^{b}	230^{ab}	2.38^{a}	537^{a}	227^{a}	2.37^{a}
4	594^{a}	289^{b}	2.06^{a}	455^{b}	232^{ab}	1.96^{bc}	508^{b}	221^{ab}	2.30^{a}
5	610^{a}	308^{a}	1.99^{ab}	548^{a}	252^{a}	2.17^{ab}	505^{b}	239^{a}	2.11^{b}
6	614^{a}	316^{a}	1.95^{b}	538^{a}	243^{a}	2.46^{a}	511^{b}	223^{ab}	2.29^{a}
7	591^{a}	285^{b}	2.08^{a}	454^{b}	235^{ab}	1.93^{c}	504^{b}	218^{b}	2.32^{a}
8	611^{a}	292^{ab}	2.09^{a}	560^{a}	227^{ab}	2.47^{a}	528^{a}	233^{a}	2.26^{ab}
SEM[4]	4.6	7.8	0.293	12.7	9.3	0.27	3.9	7.2	0.122
P-Value	0.001	0.07	0.003	0.001	0.02	0.02	0.001	0.02	0.02

[1] در هر ستون اعداد با حروف غیر مشابه از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری دارند (P<0/05).

[2] 1) جیره پایه (شاهد)، 2) شاهد + آنتی‌بیوتیک کلی‌استاپ 10، 3) شاهد + اسانس هیدروالکلی مرزنگوش (200 میلی‌گرم در کیلوگرم)، 4) شاهد + اسانس هیدروالکلی مرزنگوش (400 میلی‌گرم در کیلوگرم)، 5) شاهد + اسانس هیدروالکلی گندواش (200 میلی‌گرم در کیلوگرم)، 6) شاهد + اسانس هیدروالکلی گندواش (400 میلی‌گرم در کیلوگرم)، 7) شاهد + اسانس هیدروالکلی شاه‌اسپرم (200 میلی‌گرم در کیلوگرم) و 8) شاهد + اسانس هیدروالکلی شاه‌اسپرم (400 میلی‌گرم در کیلوگرم).

[3] FI= خوراک مصرفی، BW= وزن بدن و FCR= ضریب تبدیل خوراک

[4] SEM= خطای استاندارد میانگین‌ها.

[1] Means within the same line with no common superscript letter differ significantly (P < 0.05).
[2] 1) Control= basal diet, 2) Control + Coli-stop 10 (200 mg/Kg), 3 and 4) Control+ Marjoram essential oil (200 and 400 mg/Kg), 5 and 6) Control+ Fennel essential oil (200 and 400 mg/Kg) and 7 and 8) Control+ *Tanacetum Balsamita* essential oil (200 and 400 mg/Kg).
[3] FI= Feed intake, BW- Body weight and FCR= Feed conversion ratio.
[4] SEM: Standard error of means.

تأثیر تیمارهای آزمایشی بر جمعیت سلول‌های خونی جوجه‌های گوشتی سالم، آلوده شده با اشریشیاکلی و آلوده شده با سالمونلا به ترتیب در جدول 6 نشان داده شده است. تأثیر اسانس‌های گندواش، شاه‌اسپرم و مرزنگوش بر جمعیت سلول‌های خونی جوجه‌های گوشتی سالم معنی‌دار بود. جوجه‌های دریافت‌کننده آنتی‌بیوتیک، 200 و 400 میلی‌گرم اسانس شاه‌اسپرم و 200 میلی‌گرم اسانس مرزنگوش نسبت به گروه شاهد لنفوسیت کمتری داشتند در حالی که تمامی افزودنی‌ها نسبت به گروه شاهد موجب افزایش هتروفیل و نسبت هتروفیل به لنفوسیت جوجه‌های گوشتی شد ($P < 0/05$).

در جوجه‌های گوشتی آلوده شده با اشریشیاکلی، جوجه‌های دریافت‌کننده جیره دارای 400 میلی‌گرم اسانس مرزنگوش نسبت به گروه شاهد درصد لنفوسیت بیشتر و نسبت هتروفیل به لنفوسیت کمتری داشتند ($P < 0/05$) ضمن اینکه تأثیر افزودنی‌ها بر درصد هتروفیل جوجه‌های گوشتی آلوده شده با اشریشیاکلی معنی‌دار نبود ($P > 0/05$).

تأثیر استفاده از اسانس‌های گندواش، شاه‌اسپرم و مرزنگوش بر جمعیت سلول‌های خونی جوجه‌های گوشتی آلوده شده با سالمونلا معنی‌دار نبود و بین تیمارهای آزمایشی تفاوت آماری معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0/05$). اسانس‌های گندواش، شاه‌اسپرم و مرزنگوش بر طول ویلی ژئوژنوم تأثیر معنی‌داری نداشتند ($P > 0/05$ ؛ جدول 7). همچنین بافت روده جوجه‌های گوشتی آلوده شده با باکتری‌ها و جوجه‌های سالم تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند و ضایعاتی در سلول-های روده، سلول‌های گابلت و ماکروفاژها جوجه‌های آلوده شده مشاهده نشد (شکل‌های 1-3). تأثیر تیمارهای آزمایشی بر جمعیت میکروبی جوجه‌های گوشتی سالم، آلوده شده با اشریشیاکلی و آلوده شده با سالمونلا در جدول 8 نشان داده شده است. تأثیر اسانس‌های گندواش، شاه‌اسپرم و مرزنگوش بر جمعیت باکتری اشریشیاکلی ایلئوم جوجه‌های گوشتی سالم معنی‌دار نبود ($P > 0/05$) در حالی‌که جوجه-های دریافت کننده جیره دارای 400 میلی‌گرم اسانس شاه‌اسپرم و مرزنگوش نسبت به گروه شاهد باکتری لاکتوباسیل بیشتری داشتند ($P < 0/05$).

جدول 6- تأثیر تیمارهای آزمایشی بر شمار گلبول‌های سفید خون جوجه‌های گوشتی در روز چهاردهم[1]

Table 6- Effect of dietary treatments on white blood cell count of broiler chickens in day 14th[1]

جیره‌های آزمایشی[2]	No Challenge[3]			Challenged with E. coli[3]			Challenged with Salmonella[3]		
Experimental diets[2]	H%	L%	H:L	H%	L%	H:L	H%	L%	H:L
1	26.37[d]	72.44[a]	37.14[d]	32.49[ab]	66.19[b]	0.51[a]	36.54	60.69	0.62
2	33.58[bc]	65.09[b]	52.23[bc]	33.67[a]	65.21[b]	0.52[a]	37.09	60.53	0.44
3	31.22[cd]	68.24[ab]	46.09[cd]	28.17[ab]	70.15[ab]	0.41[ab]	39.73	57.75	0.69
4	30.43[cd]	68.19[ab]	45.37[cd]	26.67[b]	72.66[a]	0.37[b]	39.67	56.69	0.71
5	37.03[ab]	59.68[c]	63.96[ab]	28.22[ab]	70.50[ab]	0.41[ab]	39.68	58.52	0.81
6	30.19[cd]	66.29[ab]	48.24[cd]	33.16[b]	65.48[b]	0.51[a]	41.53	56.18	0.75
7	41.14[a]	57.43[c]	74.08[a]	27.67[ab]	70.21[ab]	0.39[ab]	30.24	67.48	0.64
8	41.37[a]	56.73[c]	74.32[a]	31.26[ab]	67.74[ab]	0.46[ab]	35.21	62.47	0.58
SEM[4]	1.86	1.77	0.47	1.82	1.73	0.032	3.84	3.31	0.094
P-Value	0.001	0.001	0.001	0.057	0.044	0.04	0.51	0.33	0.54

[1] در هر ستون اعداد با حروف غیر مشابه از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری دارند ($P<0/05$).

[2] 1) جیره پایه (شاهد)، 2) شاهد + آنتی‌بیوتیک کلی‌استاپ 10، 3) شاهد + اسانس هیدروالکلی مرزنگوش (200 میلی‌گرم در کیلوگرم)، 4) شاهد + اسانس هیدروالکلی مرزنگوش (400 میلی‌گرم در کیلوگرم)، 5) شاهد + اسانس هیدروالکلی گندواش (200 میلی‌گرم در کیلوگرم)، 6) شاهد + اسانس هیدروالکلی گندواش (400 میلی‌گرم در کیلوگرم)، 7) شاهد + اسانس هیدروالکلی شاه‌اسپرم (200 میلی‌گرم در کیلوگرم) و 8) شاهد + اسانس هیدروالکلی شاه‌اسپرم (400 میلی‌گرم در کیلوگرم).

[3] L= لنفوسیت، H= هتروفیل و H:L = نسبت هتروفیل به لنفوسیت.

[4] SEM= خطای استاندارد میانگین‌ها.

[1] Means within the same line with no common superscript letter differ significantly ($P < 0.05$).

[2] 1) Control= basal diet, 2) Control + Coli-stop 10 (200 mg/Kg), 3 and 4) Control+ Marjoram essential oil (200 and 400 mg/Kg), 5 and 6) Control+ Fennel essential oil (200 and 400 mg/Kg) and 7 and 8) Control+ *Tanacetum Balsamita* essential oil (200 and 400 mg/Kg).

[3] L= Lymphocyte, H= Heterophil and H:L= Heterophil to lymphocyte ratio.

[4] SEM: Standard error of means.

جدول 7- تأثیر تیمارهای آزمایشی بر طول ویلی ژئوژنوم جوجه‌های گوشتی سالم و آلوده شده (میکرومتر)[1]

Table 7- Effect of dietary treatments on the length of villi jejunum in broiler chicks (µm)[1]

جیره‌های آزمایشی[2] Experimental diets[2]	No Challenge	Challenged with Coli. E	Challenged with Salmonella
1	1072	838	979
2	1101	977	1194
3	1050	1176	1114
4	1194	1118	990
5	1021	1139	1067
6	947	1107	1080
7	1168	1167	1160
8	1159	926	1115
SEM[3]	68.3	95.6	47.4
P-Value	0.15	0.17	0.063

[1] در هر ستون اعداد با حروف غیر مشابه از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری دارند (P<0/05).

[2] 1) جیره پایه (شاهد)، 2) شاهد + آنتی‌بیوتیک کلی‌استاپ 10، 3) شاهد + اسانس هیدروالکلی مرزنگوش (200 میلی‌گرم در کیلوگرم)، 4) شاهد + اسانس هیدروالکلی مرزنگوش (400 میلی‌گرم در کیلوگرم)، 5) شاهد + اسانس هیدروالکلی گندواش (200 میلی‌گرم در کیلوگرم)، 6) شاهد + اسانس هیدروالکلی گندواش (400 میلی‌گرم در کیلوگرم)، 7) شاهد + اسانس هیدروالکلی شاهاسپرم (200 میلی‌گرم در کیلوگرم) و 8) شاهد + اسانس هیدروالکلی شاهاسپرم (400 میلی‌گرم در کیلوگرم).

[3] SEM= خطای استاندارد میانگین‌ها.

[1] Means within the same line with no common superscript letter differ significantly (P < 0.05).
[2] 1) Control= basal diet, 2) Control + Coli-stop 10 (200 mg/Kg), 3 and 4) Control+ Marjoram essential oil (200 and 400 mg/Kg), 5 and 6) Control+ Fennel essential oil (200 and 400 mg/Kg) and 7 and 8) Control+ *Tanacetum Balsamita* essential oil (200 and 400 mg/Kg).
[3] SEM: Standard error of means.

جدول 8- تأثیر تیمارهای آزمایشی بر جمعیت میکروبی ایلئوم جوجه‌های گوشتی سالم و آلوده شده (10^7 × cfu/g,1)[1]

Table 8- Effect of dietary treatments on ileal bacterial counts (cfu/g, 1×10^7)[1]

جیره‌های آزمایشی[2]	Salmonella Challenged		E. coli Challenged		No Challenge	
Experimental diets[2]	Lactobacillus	Salmonella	Lactobacillus	E. coli	Lactobacillus	E. coli
1	41^{a}	11^{c}	168	68^{a}	21^{c}	185
2	23^{ab}	21^{b}	91	28^{b}	84^{b}	104
3	8^{b}	7^{c}	44	16^{d}	45^{bc}	75
4	13^{b}	8^{c}	133	5^{e}	75^{b}	164
5	4^{b}	43^{a}	129	36^{bc}	44^{bc}	130
6	13^{b}	5^{c}	211	43^{b}	43^{bc}	231
7	18^{b}	6^{c}	45	8^{e}	51^{bc}	54
8	10^{b}	10^{c}	15	5^{e}	168^{a}	21
SEM[3]	6.5	2.3	55.4	3.1	14.1	69.2
P-Value	0.016	0.001	0.43	0.001	0.001	0.43

[1] در هر ستون اعداد با حروف غیر مشابه از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری دارند (P<0/05).

[2] 1) جیره پایه (شاهد)، 2) شاهد + آنتی‌بیوتیک کلی‌استاپ 10، 3) شاهد + اسانس هیدروالکلی مرزنگوش (200 میلی‌گرم در کیلوگرم)، 4) شاهد + اسانس هیدروالکلی مرزنگوش (400 میلی‌گرم در کیلوگرم)، 5) شاهد + اسانس هیدروالکلی گندواش (200 میلی‌گرم در کیلوگرم)، 6) شاهد + اسانس هیدروالکلی گندواش (400 میلی‌گرم در کیلوگرم)، 7) شاهد + اسانس هیدروالکلی شاهاسپرم (200 میلی‌گرم در کیلوگرم) و 8) شاهد + اسانس هیدروالکلی شاهاسپرم (400 میلی‌گرم در کیلوگرم).

[3] SEM= خطای استاندارد میانگین‌ها.

[1] Means within the same line with no common superscript letter differ significantly (P < 0.05).
[2] 1) Control= basal diet, 2) Control + Coli-stop 10 (200 mg/Kg), 3 and 4) Control+ Marjoram essential oil (200 and 400 mg/Kg), 5 and 6) Control+ Fennel essential oil (200 and 400 mg/Kg) and 7 and 8) Control+ *Tanacetum Balsamita* essential oil (200 and 400 mg/Kg).
[3] SEM: Standard error of means.

نسبت به گروه شاهد، جمعیت باکتری اشریشیاکلی جوجه‌های گوشتی آلوده شده با اشریشیاکلی در اثر افزودن تمامی اسانس‌ها به جیره کاهش یافت (P < 0/05) در حالی‌که افزودن اسانس‌ها بر جمعیت لاکتوباسیلوس ایلئوم جوجه‌ها تأثیری نداشتند (P > 0/05). همچنین، تفاوت معنی‌داری بین تمامی افزودنی‌ها با جیره شاهد در جمعیت سالمونلای ایلئوم جوجه‌های گوشتی آلوده شده با سالمونلا

مشاهده نشد ($P > 0/05$) اما جمعیت لاکتوباسیل جوجه‌های گوشتی دریافت کننده جیره حاوی اسانس‌های گندواش، شاه‌اسپرم و مرزنگوش و آلوده شده با سالمونلا نسبت به گروه شاهد کاهش یافت ($P < 0/05$).

بحث

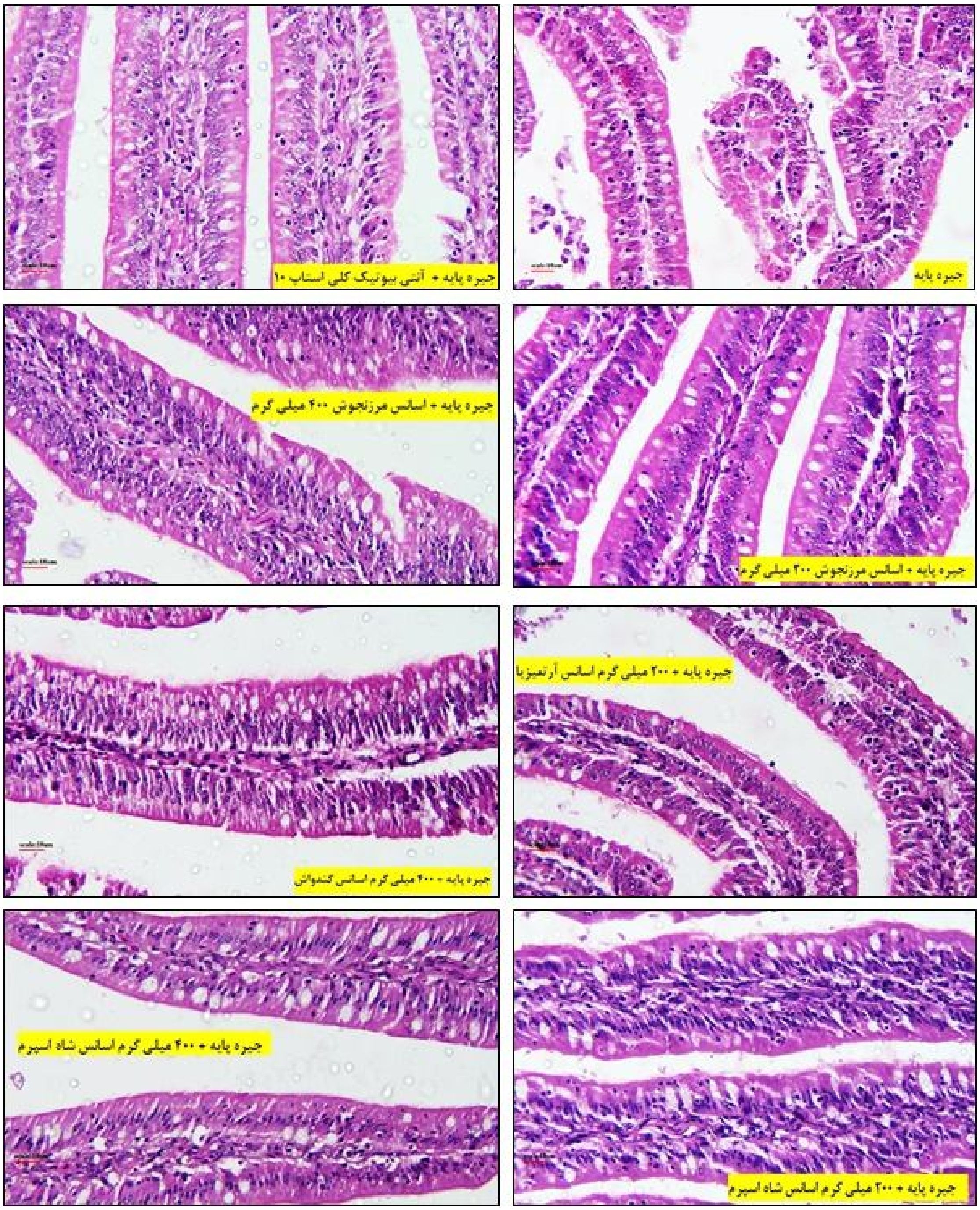
مطلوب‌ترین راهبرد ممکن در پرورش طیور، روشی خواهد بود که به تولید گوشت عاری از بقایای آنتی‌بیوتیک منجر شود. در تحقیق حاضر اثرات ضد باکتری اسانس 5 گونه گیاهی بر 3 گونه از باکتری‌های گرم منفی به روش انتشار در آگار به شیوه دیسک دیفیوژن[1] مورد بررسی قرار گرفت. بر مبنای تئوری، قطر هاله عدم رشد پاسخی از غلظت ماده مؤثره موجود در گیاهان است. این رویداد یک ارتباط خطی بین اندازه هاله و لگاریتم غلظت مواد مؤثر گیاه مورد آزمایش می‌باشد که با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد و مقایسه با آنتی‌بیوتیک مورد نظر، میزان خاصیت ضد میکروبی گیاه مورد مطالعه تعیین می‌شود (29). بنابراین، هرچه میزان قطر هاله عدم رشد بیشتر باشد، خاصیت ضد میکروبی آن ماده بیشتر است و در غلظت‌های بالاتر به دلیل وجود میزان بیشتری مواد ضدمیکروبی، قطر هاله عدم رشد افزایش می‌یابد.

با توجه به نتایج آزمایش اول مشاهده شد که تفاوت در حساسیت‌های باکتری‌ها نسبت به اسانس‌های مختلف وجود دارد اما بهترین نتایج در غلظت 50 میلی‌گرم بر لیتر از اسانس‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و تتراسایکلین به دست آمد و در غلظت‌های پایین‌تر، اسانس‌ها خاصیت ضدباکتریایی کمتری داشتند. ترپن‌ها و فنیل‌پروپن‌های موجود در اسانس‌ها به علت چربی دوست بودن، به غشاء سلولی باکتری‌ها رخنه و وارد بخش‌های داخلی میکروارگانیسم‌ها می‌شوند که خصوصیات ساختمانی اسانس‌ها مانند حضور گروه‌های فعال و آروماتیکی مسئول خاصیت ضد میکروبی آن‌ها است (25).

ترکیبات مؤثره اسانس‌ها مستقیماً با لایه فسفولیپیدی غشاء باکتری‌ها واکنش می‌دهند و سبب افزایش نفوذپذیری یون‌ها و نشت ترکیبات داخل سلول یا اختلال در سیستم آنزیمی باکتری‌ها می‌شوند و باکتری‌های گرم منفی دارای لایه خارجی در غشاء فسفولیپیدی هستند. این غشاء خارجی انتشار مواد آب‌گریز از میان این لایه پوشاننده لیپوپلی‌ساکاریدی را محدود و باکتری‌ها را نسبت به این ترکیبات محافظت می‌کند (28). در این زمینه، اثر عصاره روغنی، متانولیک و اتانولیک دانه گیاه رازیانه را بر باکتری‌های جنس باسیلوس، اشرشیاکلی، *کلبسیلا پنومونیه* و گونه‌های پسودوموناس بر روی محیط مولرهینتون به وسیله روش دیسک دیفیوژن مطالعه و مشاهده کردند که قطر هاله‌های عدم رشد نسبت به کنترل‌های موجود قابل قبول ارزیابی گردید (12). در تحقیق دیگری، مشخص شد که اسانس الکلی مرزنگوش خاصیت ضد باکتری قوی‌تری علیه باکترهای *Escherichia coli*، *Pseudomonas fluorescens* و *Bacillus cereus* نسبت به اسانس اتانولی آن دارد (11). با توجه به نتایج بدست‌آمده در این تحقیق نیز خاصیت ضدباکتریایی اسانس مرزنگوش تائید شد. همچنین، اسانس گندواش مانع رشد باکتری *Escherichia coli* نمی‌شود (19) اما در تحقیق حاضر، عدم تأثیر اسانس گندواش بر هاله عدم رشد این باکتری احتمالاً به تفاوت در فعالیت ضدباکتریایی این اسانس به علت تفاوت در شیوه استخراج اسانس مربوط باشد (20).

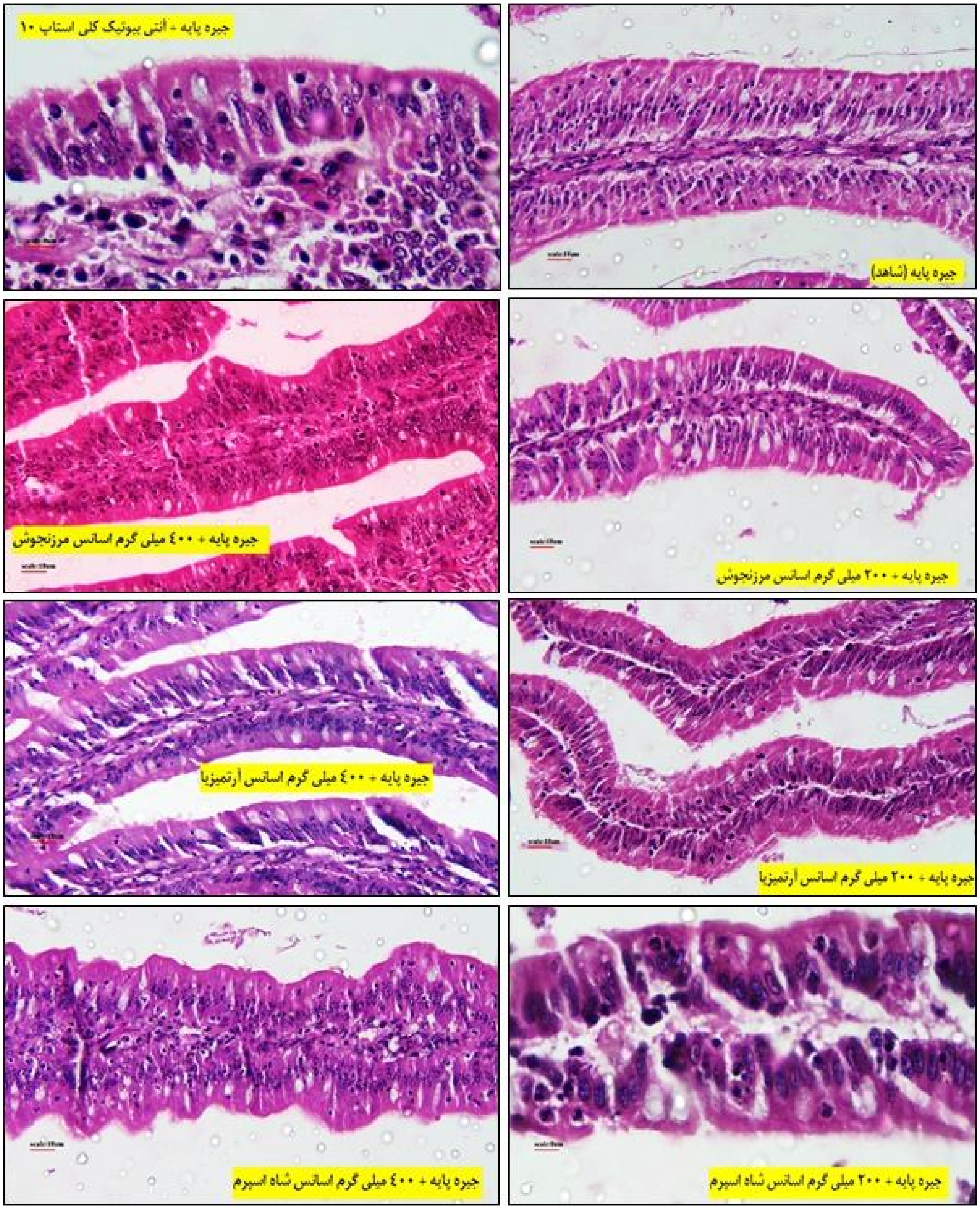
با توجه به نتایج آزمایش اول، در آزمایش دوم از اسانس سه گیاه داروئی شاه‌اسپرم، گندواش و مرزنگوش به دلیل داشتن خاصیت ضدمیکروبی بالاتر استفاده شد و مشاهده گردید که فقط طی هفته دوم افزودن اسانس گیاهان دارویی موجب بهبود عملکرد (خوراک مصرفی و افزایش وزن) جوجه‌های گوشتی آلوده شده با باکتری‌های اشریشیاکلی و سالمونلا شد. با توجه به اینکه جمعیت باکتری‌های لاکتوباسیل ایلئوم نیز به‌واسطه افزودن اسانس‌ها بهبود یافته است، چنین به نظر می‌رسد که تأثیرگذاری اسانس‌ها نیاز به حداقل زمان یک هفته تا 10 روز پس از مصرف دارد. نتایج این تحقیق با نتایج سایر محققین (3، 7) مطابقت داشت. در حالی که مطالعه دیگری، محققین گزارش کردند که استفاده از 300 میلی‌گرم بر کیلوگرم جیره اسانس مرزنگوش و 300 میلی‌گرم بر کیلوگرم جیره اسانس سیر بر وزن جوجه‌های گوشتی تأثیری نداشتند (23). همچنین افزودن اسانس مرزنگوش به میزان 300 میلی‌گرم در کیلوگرم خوراک در جوجه‌های گوشتی باعث افزایش وزن بدن و بهبود ضریب تبدیل خوراک شد (5، 10). گزارش شده است که سطوح مختلف پودر گیاه شاه‌اسپرم (1، 1/5 و 2 درصد) همراه با سطح 0/1 درصد پروبیوتیک سبب بهبود مصرف خوراک جوجه‌های گوشتی شد که مشابه با نتایج آزمایش حاضر بود (26). جوجه‌های آلوده شده، با وجود مصرف خوراک بیشتر نسبت به جوجه‌های سالم، از افزایش وزن قابل قبول و منطقی برخوردار نبودند و ضریب تبدیل خوراک جوجه‌های آلوده شده در برخی تیمارها کاهش و در برخی افزایش داشت. با این وجود، محققان دلیل بهبود ضریب تبدیل خوراک با مصرف اسانس‌ها را، ثبات اکوسیستم دستگاه گوارش جوجه‌ها بیان نموده‌اند که به دلیل وجود مواد فعالی مانند تیمول و کارواکرول که در گیاهان داروئی سبب کنترل عوامل بیماری‌زا، کاهش تولید اسیدهای چرب فرار و ثبات pH دستگاه گوارش و در نهایت بهبود ضریب تبدیل حیوان می‌شود (1، 10، 30).

1- Disc Diffusion



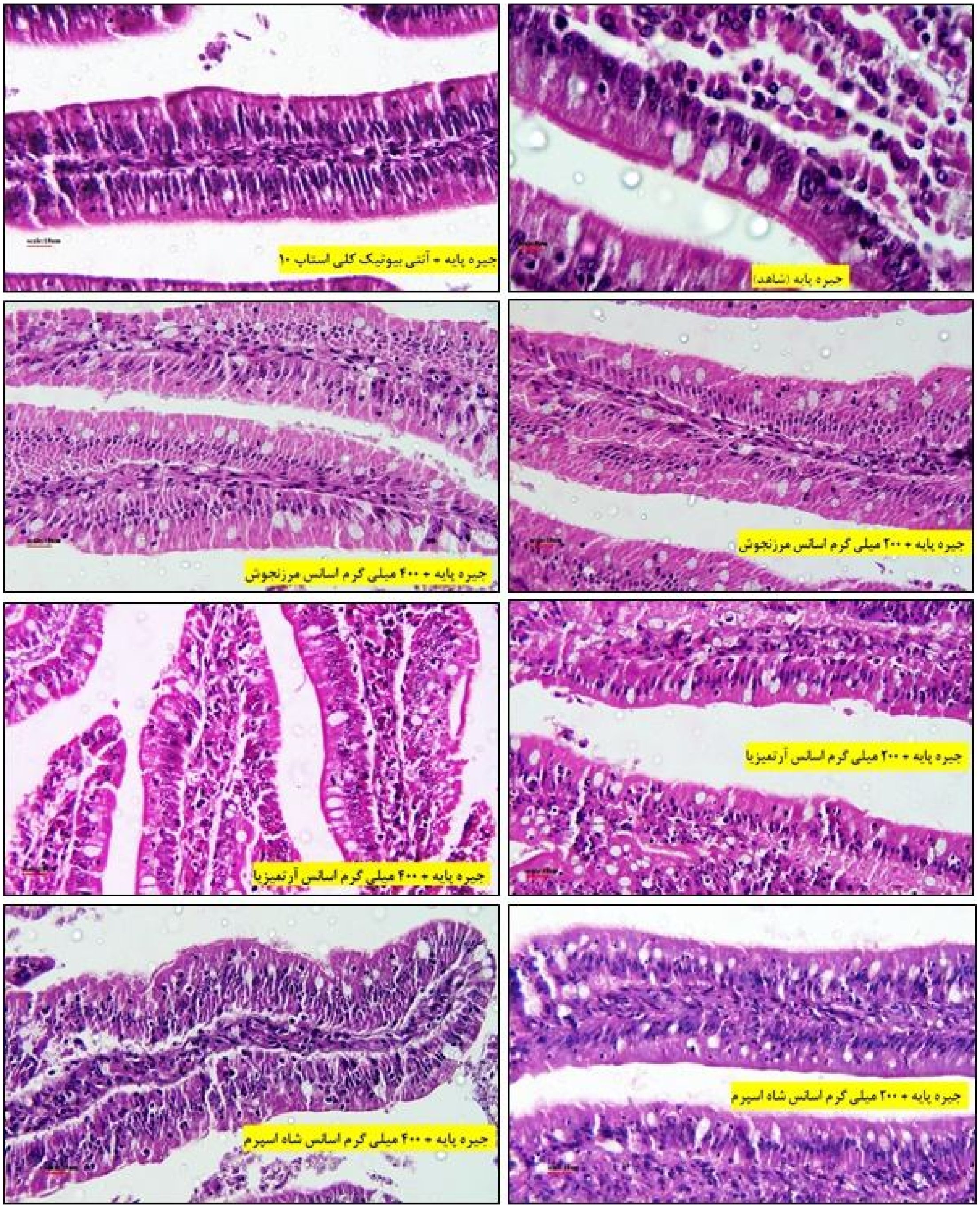
شکل 1- تأثیر تیمارهای آزمایشی بر روده جوجه‌های گوشتی سالم.

Figure 1- Effect of dietary treatments on small intestine of healthy broiler chickens



شکل 2- تأثیر تیمارهای آزمایشی بر ضایعات میکروسکوپی روده جوجه‌های گوشتی آلوده شده با باکتری اشریشیاکلی.

Figure 2- Effect of dietary treatments on microscopic lesions of small intestine of broiler chickens challenged with Escherichia Coli.



شکل 3- تأثیر تیمارهای آزمایشی بر ضایعات میکروسکوپی روده جوجه‌های گوشتی آلوده شده با باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم*

Figure 3- Effect of dietary treatments on microscopic lesions of small intestine of broiler chickens challenged with *Salmonella typhimurium*.

احتمالاً در زمان مواجه با بیماری، بیشتر خوراک مصرفی صرف نگهداری و بقاء حیوان شده و به سمت رشد و افزایش وزن حیوان سوق داده نشده است. به نظر می‌رسد که علت کاهش وزن جوجه‌های آلوده شده، کاهش جذب مواد مغذی به دلیل ضایعات میکروسکوپیک روده‌ای نباشد. زیرا بین مورفولوژی روده جوجه‌های سالم و بیمار تفاوت معنی‌داری وجود نداشت و علت کاهش وزن را باید در جایی

دور از روده و سیستم جذب جوجه‌ها جستجو کرد.

افزودن اسانس‌های گندواش، شاهاسپرم و مرزنگوش بـر جمعیـت سلول‌های خونی جوجه‌های گوشتی سالم و آلوده شده با اشریشیاکلی تأثیرگذار بود. گزارش شده است که افزودن پودر برگ مرزنگوش بـه میزان 1 درصد در جیره جوجه‌های گوشتی موجب افزایش مونوسیت و فعالیت بیشتر ماکروفاژها در ارتباط با سیستم ایمنـی مـی‌شـود (21). درحالی‌که محققین با به کار بردن سطوح (0/5 و 1 درصد) پودر گیاه شاهاسپرم و عصاره شاهاسپرم (0/1 و 0/2 درصد) گزارش کردنـد کـه سطوح مختلف و شکل‌های مختلف گیاه شاهاسپرم تأثیری بـر شـمار لنفوسیت، هتروفیل و نسبت هتروفیل به لنفوسیت نداشت.

تفاوت در نتایج ممکن است مربوط به گونه و کیفیت گیاه، ترکیب جیره و وضـعیت مـدیریت حیـوان آزمایشـی باشـد (26). تیمارهـای آزمایشی بر طول ویلی ژئونوم جوجه‌های گوشتی سالم، آلوده شده بـا اشریشیاکلی و آلوده شده با سالمونلا تأثیر نداشتند. گزارش شده است که اسانس‌ها باعث افزایش ظرفیت جذبی دستگاه گـوارش از طریـق افزایش طول و عرض ویلی و عمق کریپت و بهبود عملکـرد حیـوان می‌شوند (17) و استفاده از تیمول و کارواکرول (ماده موثره مرزنگوش) به میزان 200 و 100 میلی‌گرم بر کیلوگرم در جیره جوجه‌های گوشتی طول پرزهای ایلئوم و ژژونوم را افزایش داد (25).

افزودن اسانس‌ها سبب کاهش جمعیت بـاکتری اشریشـیاکلی در ایلئوم جوجه‌های آلوده شده با این باکتری شدند. در رابطـه بـا تـأثیر روغن‌های ضروری بر باکتری‌ها، تحقیقـات آزمایشـگاهی و حیـوانی انجام شده است. یک ارتباط قوی بین تیمول و کارواکرول موجود در اسانس مرزنگوش با فعالیت آنتی‌میکروبی آن وجود دارد که از طریق آسیب به غشای پلاسما که منجر به از دست دادن محتویـات سـلول می‌شود (8). همچنین تیمول و کارواکرول اثرات ضـدباکتریایی علیـه کلسـتریدیوم پرفـرینجنس و اشریشـیاکلی داشـته‌انـد (16، 19). خصوصیات سـاختمانی اسـانس‌هـا ماننـد حضـور گروهـای فعـال و آروماتیکی مسئول خاصیت ضد میکروبی آن‌ها است (24) و تخریـب آنتی‌ژن‌ها در روده سبب کاهش بیماری‌های روده‌ای طیور می‌شود که در نتیجه ایمنی و عملکرد طیور بهبود می‌یابد. ترکیبات موثر اسانس‌ها مستقیماً با لایه فسفولیپیدی غشاء باکتری‌هـا واکـنش داده و سـبب افزایش نفوذپذیری یون‌ها و نشت ترکیبات داخل سلول یا اختلال در سیستم آنزیمی باکتری‌ها می‌شوند (28). در آزمایش حاضر، افـزودن اسانس‌ها به ویژه اسانس شاهاسپرم به جیره طیور، تعداد باکتری‌هـای لاکتوباسیل را افزایش داد. لاکتوباسیل‌ها جزء بـاکتری‌هـای معمـول دستگاه گوارش هستند. سویه‌هـای لاکتوباسـیل بـه دلیـل تـأثیر بـر سلامت طیور و تحریک رشد، در دسته باکتری‌های مفید قرار دارند و به سبب تحریک اشتها، بهبود تعادل فلور میکروبی، سنتز ویتامین‌ها، تحریک آنزیم‌های هضـمی، اسـتفاده از کربوهیـدرات‌هـای غیرقابـل هضم، تحریک اسید لاکتیک، کاهش pH و آزادسازی باکتریوسین بر عملکرد طیور موثر هستند (22).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج آزمایش اول نشان داد که در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌ها، به-ترتیب اسانس‌های شـاه‌اسـپرم و مرزنگـوش در بـین 5 گونـه مـورد آزمایش، قوی‌ترین خاصیت ضدمیکروبی را داشتند. نتایج آزمایش دوم نشان داد که هر 3 اسانس مورد بررسی، بویژه اسـانس شـاه‌اسـپرم و گندواش، مقادیر خوراک مصرفی و افزایش وزن جوجه‌های گوشتی را بهبود داده و سبب افزایش جمعیت لاکتوباسیل‌ها و کـاهش جمعیـت باکتری‌های مضر دستگاه گوارش می‌شوند. با این وجود، بر طول ویلی روده جوجه‌های سالم و آلوده شده با باکتری اشریشیاکلی و سالمونلا تأثیرگذار نبودند. با توجه به اینکه تأثیر اسانس‌ها و آنتـی‌بیوتیـک بـر عملکرد جوجه‌های گوشتی برابر بود و اسانس‌های مورد مطالعه سبب افـزایش میـزان لاکتوباسـیل‌هـا شـدند، بنـابراین، چنـین مـی‌تـوان نتیجه‌گیری کرد که اسانس‌ها قابلیت جـایگزینی آنتـی‌بیوتیـک‌هـا را دارند.

منابع

1. Bassett, R., 2000. Oregano’s positive impact on poultry production. World Poultry-Elsevier, 16 (9): 31-34.
2. Berahou, A., A. Auhmani, N. Fdil, A. Benharref, M. Jana, and C. A. Gadhi. 2007. Antibacterial activity of quercus ilex bark's extracts. Journal of Ethnopharmacology, 112 (3): 426-429.
3. Botsoglou, N. A., D. J. Fletouris, P. Florou-Paneri, E. Christaki, and A. B. Spais. 2003. Inhibition of lipid oxidation in long-term frozen stored chicken meat by dietary oregano essential oil and α-tocopheryl acetate supplementation. Food Research International, 36(3): 207-213.
4. Brenes, A. and E. Roura. 2010. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. Animal Feed Science and Technology, 158: 1-14.
5. Çabuk, M., M. Bozkurt., A. Alcicek., Y. Akbas., and K. Kucukyilmaz. 2006. Effect of an herbal essential oil mixture on growth and internal organ weight of broilers from young and old breeder flocks. South African Journal of Animal Science, 36: 135-141.
6. Cerisuelo, A., C. Marín, F. Sánchez-Vizcaíno, E. A. Gómez, J. M. De la Fuente, R. Durán, and C. Fernández.

2014. The impact of a specific blend of essential oil components and sodium butyrate in feed on growth performance and Salmonella counts in experimentally challenged broilers. Poultry Science, 93: 599-606.

7. Cross, D. E., R. M. McDevitt, K. Hillman, and T. Acamovic. 2007. The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. British Poultry Science, 48: 496-506.
8. Chun, S. S., A. V. Vattern., Y. T. Lin., and K. Shetty. 2004. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. Process Biochemistry, 40: 809-816.
9. Ferket, P. R. 2004. Alternatives to antibiotics in poultry production: Responses, practical experience and recommendations, Page 57-67 in Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries, Lyons, T. P. and K. A. Jacques. Nottingham University Press, Nottingham. UK.
10. Giannenas, I., P. Florou-paneri., M. Papazahariadou., N. Botsoglou., E. Christaki., and A. B. Spaisn. 2003. Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. Archives in Animal Nutrition, 57: 99-106.
11. Giannenas, I., P. Florou-paneri., N. Botsoglou., E. Christaki., and A. B. Spaisn. 2005. Effect of supplementing feed with oregano and/or a-tocopheryl acetate on growth of broiler chickens and oxidative stability of meat. Journal of Animal and Feed Sciences, 14: 521-535.
12. Golfaraz. M. 2008. Antbacterial and antifungal activity of *foeniculum vulgare*. African Journal of Biotechnology, 7: 326-346.
13. Gopi, M., K. Karthik, H. V. Manjunathachar, P. Tamilmahan, M. Kesavan, M. Dashprakash, B. L. Balaraju, and M. R. Purushothaman. 2013. Essential Oils as a Feed Additive in Poultry Nutrition. Advances in Animal and Veterinary Sciences, 2(1): 1-13.
14. Hammer, K. A., C. F. Carson, and T. V. Riley. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of Applied Microbiology, 86(6): 985-990.
15. Hashemipour, H., H. Kermanshahi., A. Golian., A. Raji., and M. M. Van Krimpen. 2012. Effect of thymol + carvacrol by next enhance 150 on Intestinal development of broiler chickens fed CMC containing diet. Iranian Journal of Applied Animal Science, 3(3): 567-576.
16. Helander, I. M., H. L.Alakomi, K. Latva-Kala, T. Mattila-Sandholm, I. Pol, E. J. Smid, L.G. Gorris, and A. Von Wright. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(9): 3590-3595.
17. Jamroz, D., T. Wertelecki, M. Houszka, and C. Kamel. 2006. Influence of diet type on the inclusion of plant origin active substances on morphological and histochemical characteristics of the stomach and jejunum walls in chicken. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 90(5-6): 255-268.
18. Jang, I. S., Y. H. Ko, S. Y. Kang, and C. Y. Lee. 2007. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. Animal Feed Science and Technology, 134: 304-315.
19. Juteau, F., V. Masotti, J. M. Bessière, M. Dherbomez, and J. Viano. 2002. Antibacterial and antioxidant activities of Artemisia annua essential oil. Fitoterapia, 73(6): 532-535.
20. Kannathasan, K., A. Senthilkumar, and V. Venkatesalu. 2011. Mosquito larvicidal activity of methyl-P-hydroxybenzoate isolated from the leaves of Vitex Trifolia Linn. Acta-Tropica, 120(1-2): 115-118.
21. Khalaji, S., M. Zaghari, K. H. Hatami, S. Hedari-Dastjerdi, L. Lotfi, and H. Nazarian. 2011. Black cumin seeds, Artemisia leaves (*Artemisia sieberi*), and Camellia L. plant extract as phytogenic products in broiler diets and their effects on performance, blood constituents, immunity, and cecal microbial population. Poultry Science, 90(11): 2500-2510.
22. Khan, S. H., M. Atif, N. Mukhtar, A. Rehman, and G. Fareed. 2011. Effects of supplementation of multi-enzyme and multi-species probiotic on production performance, egg quality, cholesterol level and immune system in laying hens. Journal of Applied Animal Research, 39(4): 386-398.
23. Kırkpınar, F., H. B. Ünlü, and G. Özdemir. 2011. Effects of oregano and garlic essential oils on performance, carcass, organ and blood characteristics and intestinal microflora of broilers. Livestock Science, 137(1-3): 219-225.
24. Lee, K. W., H. Everts, and A. G. Beynen. 2004. Essential oils in broiler nutrition. International Journal of Poultry Science, 3(12): 738-752.
25. Lee, K. W., H. Everts, H. J. Kappert, K. H. Yeom, and A. C. Beynen. 2003. Dietary carvacrol lowers body weight gain but improves feed conversion in female broiler chickens. Journal of Applied Poultry Research, 12(4): 394-399.
26. Mansoub, N.H., 2011. Comparative influence of using different level of *Tanacetum balsamita* with probiotic on performance and serum composition of broiler chickens. Advances in Environmental Biology, 2708-2712.
27. Sakar, M. K., D. Şöhretoğlu, M. Özalp, M. Ekizoğlu, S. Piacente, and C. Pizza. 2005. Polyphenolic compounds and antimicrobial activity of Quercus aucheri leaves. Turkish Journal of Chemistry, 29(5): 555-559.
28. Sandri, I. G., J. Zacaria, F. Fracaro, A. P. L. Delamare, and S. Echeverrigaray. 2007. Antimicrobial activity of the

essential oils of Brazilian species of the genus Cunila against foodborne pathogens and spoiling bacteria. Food Chemistry, 103(3): 823-828.
29. Shirazi, M. H., GH. Amin, B. Akhondi Lavasani, and S. Eshraghi. 2012. Microbial growth inhibitory effect of Adiantum capillus-veneris extract on gram positive and gram negative bacteria. Medicinal Plant, 4(40): 124-132 (in Persian).
30. Vagia, E., B. Simandi, A. Suhajd, and E´. He´thely. 2005. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana L.* extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. Food Research International, 38: 51-57.

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 11, No. 4, Winter 2020, p. 463-479

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد 11، شماره 4، زمستان 1398، ص. 479-463

Use of essential oils in broiler chickens: *In-vitro* antimicrobial activities and effects on growth performance, intestinal morphology and microflora

Ali Khatibjoo[1*], Maryam Aalaei[2], Farshid Fattahnia[3], Mostafa Neamati[4], Mohammadreza Hafezi-ahmadi[5] and Hooman Farzadi[6]

Received: 25-12-2018
Accepted: 11-06-2019

Introduction: Antibiotics as growth promoters in poultry feed are posing serious health risks to human health. Because of their residual effects in poultry meat and eggs, as well as result pathogens develop resistance to antibiotics. Currently, poultry scientists are challenged to find out alternatives to antibiotic growth promoters with no side effects for poultry that could be more or as effective against harmful microorganisms in the gastrointestinal tract and to stimulate the growth by increasing the efficiency of feed utilization and to enhance the immunity. Regarding to this subject, supplementing the dietary herbs or plant extracts would stimulate the productive performance of poultry. In recent years, products containing essential oils derived from several spices and herbs could be used feed additives as growth promoters in animal nutrition. These phytogenic additives may have more than one mode of action, including improving feed intake and flavor, stimulating the secretion of digestive enzymes, increasing gastric and intestinal motility, endocrine stimulation, antimicrobial, anti-viral, anthelminthic and coccidiostat activities, immune stimulation, and anti-inflammatory and anti-oxidative activity and pigments. Many studies have also been conducted on the effects of dietary essential oils or combinations thereof on the performance of poultry but with varying and conflicting results. While one report demonstrated that essential oils improved animal performance, some researchers reported that these additives were not effective in this regard. Salmonella and Escherichia Coli bacteria have become the major cause of foodborne diseases which has raised a great safety concern to public health. In several geographic regions, a large proportion of foodborne diseases are confirmed by the hazardous salmonellosis caused by infectious Salmonella. The antibacterial effects of essential oils have received widespread attention and numerous reports exist in the literature. The essential oil of oregano has been shown to inhibit *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. The aims of this study were to investigate the *In-Vitro* and *In-Vivo* effects of 5 dietary essential oils, marjoram, tanacetum balsamita, Artemisia annua, Fennel and Pinus, on minimal bactericide concentration (MBC) and minimal inhibitory concentration (MIC) of 5 bacteria strains including *Escherichia coli* (PTCC 1399), *Klebsiella pneumonia* (PTCC 1053), *Salmonella typhimurium* (PTCC1609), *Staphylococcus aureus* (PTCC 1764) and *Streptococcus pyogenes* (PTCC 1447) and performance and intestinal microflora of broiler chickens challenged with *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*.

Materials and Methods: The disc diffusion method, the minimum inhibitory concentration (MIC), and the minimum bactericidal concentration (MBC) were applied for the determination of antimicrobial activities of essential oils. In vivo study, a total of three hundred eighty four 1-d-old broiler chickens were assigned to 8 dietary treatment groups: 1) Control= basal diet, 2) Control + Virginiamycin (200 mg/Kg), 3 and 4) Control+ Marjoram Hydro alcoholic essential oil (200 and 400 mg/Kg), 5 and 6) Control+ Fennel hydro alcoholic essential oil (200 and 400 mg/Kg) and 7 and 8) Control+ Tanacetum Balsamita Hydro alcoholic essential oil (200 and 400 mg/Kg). At the second week of life (8-14 d) the broilers of each replicate in all of the treatments divided to 3 part (4 broilers in each treatment) and one group had no challenge, and the 2 other groups were challenged with challenged with *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium.* Essential oils were provided by Giah-Essanse Company in Golestan Province. The diets were formulated to meet the requirements of broilers as established by the Ross 308 broilers feeding guide in starter (1-14 d). The birds

1- Assistant Prof. of animal science group of Ilam University
2- PhD graduate student of animal science group of Ilam University
3- Associated Prof. of animal science group of
4- Assistant Prof. of Microbiology group of Veterinary faculty of Ilam University
5- Professor of Histology group of Medical University of Ilam
6- Veterinary Medicine of Ilam University
(*-Corresponding author email address: a.khatibjoo@ilam.ac.ir or a.khatibjoo@gmail.com)

were kept under conventional conditions for vaccination, temperature, ventilation, and lighting based on Ross 308 catalogue recommendations. Standard management practices of commercial broiler production were applied. The broiler diets were formulated based on standardized ileal digestible amino acids and other requirements were obtained from Ross catalogue recommendations. Broiler chicken performance (feed intake, body weight gain, feed conversion efficiency at the end of the first and second week of age), blood cell count and ileal morphology were measured. Finally population of *Lactobacillus* and *Escherichia coli* of ileum were detected.

Results and Discussion: The results showed that fennel, tanacetum and marjoram essential oils inhibited the growth of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* and the greatest MBC belonged to tanacetum essential oil as compared to virginiamycin. Inclusion of essential oils improved feed intake and body weight gain of broiler chickens changed with *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium. Escherichia coli*-challenged broiler chickens fed diet supplemented with essential oils had higher lymphocyte percentage and lower heterophil to lymphocyte ratio as compared to control group. Essential oils significantly increased *Lactobacillus and decreased Escherichia coli* count of healthy and *Escherichia coli* challenged broiler chickens compared to control group respectively.

Conclusion: In conclusion, supplementation of essential oil had MIC and MBC effects and improved growth performance of broiler chickens challenged with *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. It is suggested that these essential oils can be supplemented to broiler chickens diet as substitution of antibiotics.

Keywords: Broiler Chicken, Essential Oil, *Escherichia coli*, Growth Performance, *Salmonella typhimurium*